«УТВЕРЖДЕНА»
Приказом Росздравнадзора
от «18» ноября 2011 г. № 7495-Пр/11

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **ПРОГЕСТЕРОНА** В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА **(«СтероидИФА-прогестерон»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СтероидИФА-прогестерон» предназначен для количественного определения прогестерона в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Прогестерон – стероидный гормон с молекулярной массой 314 Да. Количественное определение уровня прогестерона в крови имеет диагностическое значение при оценке функционального состояния желтого тела, наблюдении за протеканием беременности и может проводиться в исследовательских целях.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1.3. Набор «СтероидИФА-прогестерон» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: *в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

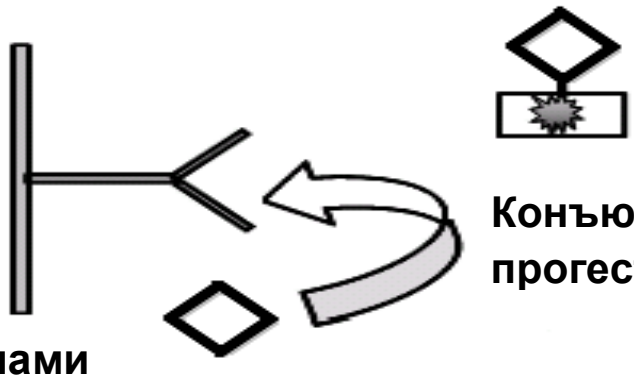
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «СтероидИФА-прогестерон» использован вариант конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата прогестерон-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным прогестероном сыворотки крови в процессе связывания с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству прогестерона в исследуемом образце (Рисунок 1).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



Конъюгат прогестерон-пероксидаза

Планшет с антителами к прогестерону

Эндогенный прогестерон конкурирует с конъюгатом за связывание с антителами

Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации прогестерона в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация прогестерона в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к прогестерону, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к прогестерону» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества прогестерона. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

точные значения концентраций прогестерона в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 1; 3; 10; 30; 100 нмоль/л – 6 флаконов (лиофилизованные препараты или жидкости по 0,5 мл);

- конъюгат прогестерон-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» – 1 флакон (18 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» – 1 флакон (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием прогестерона, маркирована «Контрольная сыворотка» – 1 флакон (лиофилизованный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к прогестерону с другими стероидами приведена в Таблице 1.

Таблица 1

СТЕРОИД	Перекрестная реакция, %
Прогестерон	100,0
5-α-прегнан-3,20-дион	10,5
6-α-метил-17-α-гидроксипрогестерон ацетат	1,00
Кортикостерон	0,01
Прегненолон	0,90
11-Дезоксикортикостерон	0,30
11-Дезоксикортизол	0,03

3.2. Коэффициент вариации результатов определения прогестерона в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «СтероидИФА-прогестерон» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации прогестерона в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» прогестерона — проверка

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

соответствия значения определяемой концентрации прогестерона расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация прогестерона в сыворотке крови человека не превышает 0,5 нмоль/л.

3.6. Диапазон ожидаемых значений. Содержание прогестерона измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 60 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Концентрация прогестерона в сыворотке крови женщин с нормальным менструальным циклом в фолликулиновой фазе составила 0,5–6 нмоль/л, в лютеиновой фазе — 10–89 нмоль/л. Концентрация прогестерона в сыворотке крови мужчин составила 0,5–5,2 нмоль/л.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

Примечание: *в наборе «СтероидИФА-прогестерон» значения концентраций калибровочных проб выражены в нмоль/л. Для пересчета концентраций в нг/мл необходимо значение концентрации в нмоль/л умножить на 0,314.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не разрешается использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2…8°С не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°С и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18…25°С) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 1,5 мл.

7.1.4. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.1.5. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.6. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18…25°С).

На странице 18 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.2. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки – по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание: *общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.3. Во все лунки, кроме лунок А1 и А2, внести по 150 мкл конъюгата.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании **в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 500–800 об/мин**.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по **п. 7.1.4.**, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

комнатной температуре (+18…25°С) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.2.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре.

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. **7.2.7.**, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

Примечание: *максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: *среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации прогестерона (нмоль/л) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: *для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».*

Примечание 2: *для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо пользоваться формулой 1 или 2.*

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов для каждой калибровочной или исследуемой пробы использовать формулу:

$$B/B_1 x100\%, \qquad (1)$$

где В – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы;

B_1 *– среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу №1.*

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то использовать формулу:

$$(B-B_T)/(B_1-B_T)x100\%, \qquad (2)$$

где B_T *— среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.2. Определить содержание прогестерона в пробах по калибровочному графику.

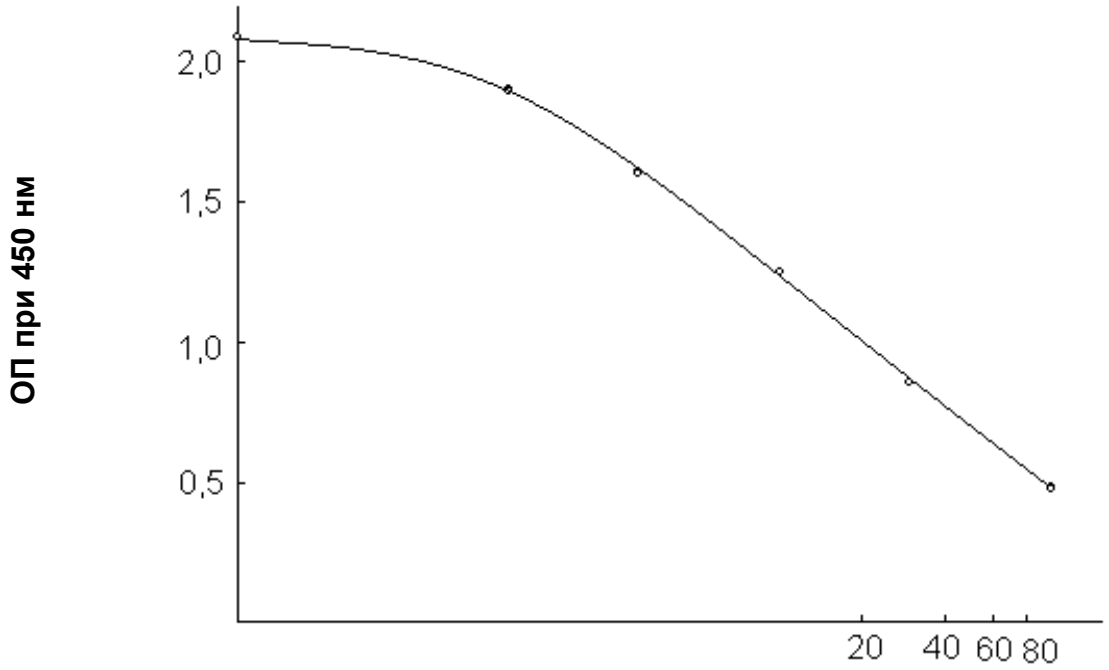


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

9.3. Для образцов сыворотки крови со значениями оптической плотности выше оптической плотности нулевого калибратора (B_1) принимать значение концентрации «ниже 0,5 нмоль/л».

9.4. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации прогестерона, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6».

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «СтероидИФА-прогестерон» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°С в течение всего срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизованных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18…25°С) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации прогестерона в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящих в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

10.8. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	***20 мкл*** КП и КС	**КТ** (+18…25°С)	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15’	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		***20 мкл*** исследуемых образцов			
3		***150 мкл*** конъюгата			
4	**Инкубация**	—	**+37°С**	60’	Термостатируемый **шейкер**, 500-800 об/мин
5	Промывка	***300 мкл*** в лунку **1*промывочного раствора** (4 раза)			**1***промывочный раствор = =14 мл буфера Р + 266 мл H_2O
6	Внесение хромогена	***100 мкл*** **ТМБ**			
7	**Инкубация с ТМБ**	—	**КТ**	15 - 30’	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	***100 мкл*** **стоп-реагента**			
9	Перемешивание		**КТ**	1 - 2’	**Шейкер**
10	Регистрация результатов	—		В течение 20’ после остановки ферментной реакции	**Фотометр,** 450 нм
11	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/соответствующее ПО

Примечания: *КП — калибровочная проба;*
КС — контрольная сыворотка;
ОП — оптическая плотность;
КТ — комнатная температура (+18...25°С);
ПО – программное обеспечение

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам качества набора «СтероидИФА-прогестерон» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит. А; тел/факс: (812) 677-8779.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru